

**JP62244382A**

## MicroPatent Report

# TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN

**[71] Applicant: AJINOMOTO CO INC**

**[72] Inventors:** MATSUI KAZUHIKO;  
SANO TAKANOSUKE;  
MIWA KIYOSHI;  
OTSUBO EIICHI

**[21] Application No.: JP61087600**

**[22] Filed: 19860416**

[43] Published: 19871024

[illegible]

**Go to Fulltext**

**[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

**CONSTITUTION:** A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RAN, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium.

**COPYRIGHT:** (C)1987,JPO&Japio

**[51] Int'l Class:** C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322  
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑮ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる  
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法  
及びトリプトファンの製造法

⑯ 特 願 昭61-87600

⑰ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年  
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑱ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑱ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑱ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑱ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6  
⑳ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン  
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、  
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用  
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1)  $\alpha$ -RNA の合成をコントロールするオペレー  
ター領域、 $\alpha$ -RNA の合成をコントロールするプロ  
モーター領域、 $\alpha$ -RNA の合成をコントロールする  
アテニューエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ  
ームと $\alpha$ -RNA との結合領域、リーダーペプチドを  
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群  
をコードする領域及び最後に $\alpha$ -RNA の合成を停止  
させるシグナルを形成するターミネーター領域が  
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCGGCTTCTG GGCATTCTGT TCCCTGAGGT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTGTG GCTGGCCCGT TGTGGGTGCT GTGGGGAGTT  
 GGGCCAACAC CCGTAAGCAC AGGGACTCCA CGCATTTAGG GTTCTTAACA CCTATACCG CGTGGCACAG CGACCGGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCAA  
 TCCTTTGTTA TTGGCTCGCT AGTTCCGTTT GTGGCCTTCT GGTTCGATGT GCGTGGTGGT GGCATTGGGT GTTGTCTGCTG CCATCGTGTT CATTCGCATG  
 AGGAACAAT AACCGAGCGA TCAACGCCAA CACCGGAAGA CCAACCTACA CGGACCAGCA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC  
 GGTGCGGGTA TGGCTGCCGA TACTGTTGGG ATGGTTGATG CGAACGCAGT CGCGAAACCC CGCAGCGCGC TGTTCGCGCT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG  
 CCACGCCCAT ACCGAGCGGT ATGACAACGC TACCAACTAC GCTTGGCTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACAAAGGCGA CTTTAACTTC TCCTCCGGCC  
 TGGTCTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAAGACTCCG CTGAATGCCC CCAAGATTGA CTTGCATGCA GTGCGTAGAG GTGCGGAAAC TACACAAGAA  
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTAACT GAACCTACGT CACGCATCTC GACGCGTTTG ATGTGTTCTT  
 CCGAAAAATG ATTAATAATT GAGACAAGCT TCCCACTATG TGATAAAGTC CCATTTTGTG AATAACTCTT GTCTCACTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGGC  
 GGGTTTTTAC TAATTATTAA CTCTGTTCCA AGGGTGATAC ACTATTTTAC GGTAAACAC TTATTGAGAA CAGAGTCACT TTCTGGGTG ACCACACCG  
 GCGCTAACTA AGCGAGCGCT ACACCTCAAG TTGTTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGGC TCGTACTTGG TTGACGAAG AAGCGGGCTT TTTGTGGTTT  
 CGCGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGCACTTC AACAAAAGTC AAACCTACTT AAAAAATTCG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTGCGCGCGA AAACACCAAA  
 TTAGCCCAAC ACCGGCAAGC CCTGGATCGA ATGAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT  
 AATCGGGTGT TGGCGGTTCC GGACCTAGCT TACTTCGAGC GTGCTCATTT AATAAACTAC AAAGGGTCTT TCCGAAGTCG GGGTGTACT AAAGGAGCCA  
 AGGTGCCCA TGAGCAGCAA TCCCAATGTT TTCTCCCTAG ATGTCCGCTA TCAGCAGGAT GCTTCTGCGT TGTTCGCGCA CTTGGGTGGC ACAACCGCAG  
 TCCACGGGT ACTCGTGCTT AGGGGTACAA AAGAGGATC TACAGGCGAT AGTGCTCTTA CGAACACGCA ACAAACGGGT GAACCCACCG TGTGGGCTC  
 ATGATGCAGC CCGTTGGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CGGTGTTGAA GAGTTCGGTG CGCATTACGT GCAGGGGCAA  
 TACTACGTCG GGACAACCTT TCGCGACTAT AGTGGTGGTT CTTACCATAA AGAAGGGAGC GCCACAACCT CTCGAAGCCAC GCGTAATGCA CGRFCCCGTT

CACGGTGGTA ACCGAGCGCG TGACGGACTC GGGTAGGGCA GTGGTTGCGC GCCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC  
 GTGCCACCAT TCGCTCGGGG ACTGCGTGAG CCCATCCCGT CACCAACGGG CGGATTGTGT CGTGGAACCG GTCATGTTGT GCGGTCTCTT GTGGAATCC  
 TTCCCGCGCT CGGATCGGGT TGATGAGCGC GAGCGCTCA CGGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGCGCA AGTTGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGCGAGC  
 AAGGGCGGGA CGCTACGCCA ACTACTCGCG CTCGCGGAGT GCGGTGCTTC GTGGTAGCTT CACGACGGCT TCAACGTCAA GCTCAGCGCG ATGTGCGTGC  
 CGTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGTTTTCC CTTTTGATTT CTAGAAACC TTTGAAACCG TCCCGCGAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACCCGGATTA  
 GCAGGGACGG TGACGAGTAC CGGCCAAAGC GGAACCTAAA GAATCTTTGG AAACCTTTGG AGGGCGCTCA GCTCCTTTCC CAGTTGTCAA TGGGGCTAAT  
 CCAGTTCTG CTCGCGGAAA TCGTCCGTGA CATCAATCAC CAGGACCAGA CCGCCAAACT CACCGCGCTC TCCAACGCCC CAGGCGAGCT CGAGGCGGAG  
 GGTCAAGCAG GAGCGCCTTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCTGTCTCT GCGGTTTGA GTGGCCGAG AGGTTGCGGG GTCCGCTCGA GCTCCGGCTC  
 CTCACAAGC TTTGATTGCT TATCGAGCGC GCGCTCCCGC CAACCGAACA CGCCTACCAA ACCACCCCTC ACCAGGGCGA CACTGTTCCG GTTGTGGCTG  
 GAGTTGTTCC AAGGTAACCA ATAGCTCCG CCGGAGGGGG GTTGGCTTGT GCGGATGGTT TGGTGGGGAG TGCTGCGCGT GTGAGAGCGC CAACACCGAC  
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTTACAACG GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGCGCGCGA CTTTCACCGC  
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG CGCTGAGTCT AGTTACTCGA CTTTCTTTTC TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTTCACAG GCGCGCGCGT GAAAGTGGCG  
 ACCATGTCTT GATGCATTCC CTGCTTATCT GCAGCTGCGT GCCACCAACC CGTGGCGGTA CATGTTCTAT ATCCGTGAC TCAACGAAGG TCGCTCCTAT  
 TGGTACAGGA CTACGTAAGC GACGAATAGA CGTCCACGCA CCGTGGTTGG GCAGCGGCAT GTACAAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA  
 GAACTTTTTC GCGCATCCCC TGAGTCCAAAC CTCAGTTTCA CGGCTGCTAA CGGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCGCCCCC CGTGAGCTCA  
 CTTGAAAAAC CGGCTAGGGG ACTCAGGTTG GAGTTCAAGT GCGGACGATT GGCACCTCGAC GTGACATGG GTTAGCGTCC ATGGCGGGGG GCACCTGAGT  
 ACCGAGATGG CTCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGAGTTGGAT ATGCGCACTG ATGCCAAAGA GATCGCGGAC GACACCATGC TTGTCGATCT  
 TGGTCTACC GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGGCGTT ACTCAACCTA TACGCGTGAC TACGTTTCT CTAGCGCGCT CTGTGATAG AACAGCTAGA  
 CCGCCGCAAC GACCTCCCCC CGGTCTCGGT CCCAGCGTGG CGCGGGGTTG CGGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC CGGTGATGCA CTTGGTCTCC  
 GCGGGCGTTG CTGGAGCGGG CGCAGAGCCA GGTCCGAGC GCGGCCCAAC GCCTAGAAAA CGTCCACCTA CGGATAAGGG CGCACTACCT GAACCAAGG

特開昭 62-244382 (3)

CGGTGACCG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG AGCGCTATCG GCGGTGCATG AATATGGGCA CGTTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGCGCTA  
GCACACTGCC GGTGCAACCT GGGTCTCGAA CTACGAAACC TCGGATAGC CCGCAGGTAC TTATACCGGT GCAACTGGCC GCGAGGCTTC AACCGCGCAT

TGGAGCTGTT GCGCGCGCTC GAAAAGCGCA GCGGTGGTTC TTATGGTGGG GCAGTGGGGT ACCTCGCGCG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT  
ACCTCGACAA CCGCGCGCAG CTTTTGCGGT CCGCACCAAG AATACCACCC CGTCACCCCA TGGACGCGCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TGCTTGGGGG TTGTCCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTGCAG GCTGGTGGTG GTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGCCGATGA GACGTTGCAC  
AGCAAGCGCG AACACGCTCC TACCACACCG AGGACAGTGC CGACCAAGAC CACACCAGGC GCTAAGATTA GGAGTTAGAC TTCGGCTACT CTGCAACGTG

AAGCGCTATG CCGTGTGAA TGCCATTGCG CTGTGTGCTG GTTCCACTTT GGAGGTGATC CGATGACACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC AGGATTCTTT  
TTCCGCATAC GGCACAACCT ACGGTAACGC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAACCTATTAG TGCTAAGAAA

TGCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTCGCGGT GCGCGGTTAT AAGTGCACGG TGTTCGCGAA TACGCTGCCA GTTGAACCA TTTTGGCAGC CAACCGCGAC  
ACAGATGTTG GACCACTTAC GCAAGCGGCA CCGGCGAATA TTCAGGTGCC ACAAGCGGTT ATGCCACGGT CAACCTTGGT AAAACCGTCC GTTGGCGCTG

CTGATCTGCC TTTCACCTGG ACCTGGTTAC CCTGCCGATG CCGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGCGCA CACTCGGCCA GATTCTTTTA CTGGCTATTT  
GACTAGACGG AAGTGGAGC TGGACCAATG GACGCGCTAC CCGGTTGTA CTACCGCGAC TAGCTCGGT GTGAGCGCGT CTAAGCAART GACCCATAAA

GCGTCGGCTA CGAGGCACTC ATCGAATACC ACGCGCGCAA GGTGAGCGCT TGTGGCGCTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCCTTA CTGATGCAGG  
CGGAGCGCAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TCGCGCGGTT CCAACTCGGA ACACCGGGAC ACGTGGCGTG GTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTC

TGTGCAGAGC CCTGTTTTG CAGGTCTTGC CACTGATGTT GAGCGTGATC ATCCAGAAGT CCCAGCGCGC AAGGTTCCAA TTGCGCGGTA TCACTCACTG  
ACAGCTCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAACG GTGACTACAA CTGGGACTAG TAGGTCTTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCGCGCAAT AGTGAGTGAC

GCGTCGCTGG TTGCGCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGGCA CCGTGTGCTC TGAGATTGGT GATGTATCA TGGCGGCAGC CACCAACCGT GCAAAGGCCA  
CCGACGCACC AACGGGGTCT GCCATAACTT AGTAACCGGT GGACAAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCGCGGTGC GTGGTGGCTA CCTTTCGGGT

TTGCGCTGCA GTTTCACCTT GAGTCAGTGC TGAGCCCAAC GGTCTCTATC ATTTGTGCC GCTGTCTGCA ACAACTTCTC CCGAACTAAT AAAAAGGATT  
AACCGGAGCT CAAAGTGGGA CTGACTCAGC ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACACGG CGACACAGCT TGTGAAGAG CGCTTGATTA TTTTCCCTAA

TGATTATGA CTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAAGC CTACTTGGGA TAACCCCACT CCAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTT ACCCCGCTGA  
ACTAAGTACT GAAGAGGTCC TTGTGACTTT CAAGAGTTGC GGATGAACCT ATTGGGGTGA GCTTGGGACC TCCTCGGTTA ACTCCACAAG TGGGGCGACT

CCGTGGCTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CTACTCCCGG GTGAGCAGTT CGCTGATATT GCGCGCGCTG CCAAGGCATT  
GGCAACCACT TATGCTACTG CACGTGTAGC GTGCGGACGA ACCGTGGTAG GCATGAGCGC CACTCGTCAA GCGACTATA GCGCCCGGAC GGTTCGCTAA

CCTCGCGCGG GCTCGTCCGT TCCCGATTAC TGGCGCAGGT TTGCTAGATT CCGCTGGCAC TGGTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCAACCGG  
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA AGGGCTAATG ACCGCGTCCA AACGATCTAA GCGGACCGTG ACCACCGCTG CCACGGTTGT GGTAGTTCTA GTGGTGGCGG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CGGTGGAGTG AAGCTGGCTA AGCAGGCAA CCGTTCAGTG AGCTCCAAGT CCGGTTCCCG CGATGTGCTG GAGGCGCTGA  
CGAAGGAGT AGCGTCTAG GCCACCTCAC TTGACCGGAT TCGTGCCGTT GGCAGGTAC TCGAGGTTCA GGCAAGGCG GCTACACGAC ATCCGCGACT

ATATTCTTT GCGCCTTGAT GTGATCGTG CTGTGAAGTG GTTCGAAGCG TCCAACCTTA CCTTCTGTT CACACCTGCG TACAACCTG CGATTGCGCA  
TATAAGGAAA CCGGGAACCTA CACCTAGCAC GACACTTAC CAAGCTTCCG AGGTTGAAGT GGAAGGACAA GTCTGGACCG ATGTTGGGAC GCTAAGCGCT

TGTGCAGCGG GTTCCGCGG CGCTGAAATT CCCCACCATC TTCAACACCG TTGACCAATT GCTGTCCCGG CCGCGCGCGG AGCGTCAGAT CATGGGCGTG  
ACACGTCCGG CAAGCGGTCC GCGACTTTAA GGGGTGGTAG AAGTTGTGCG AACCTGGTAA CGACAGGGCG CCGCGCGCGG TCGCAGTCTA GTACCGGCAC

GCCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCC GAGCTCTTCC GCGAGCTGGG CCGTACACGC GCGCTTGTG TGCATGGCGG AGCCACCGAT GAGATCGCAG  
CGGTTACGGT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCAGAAAGG CGCTCGACCC GGCATGTGCG CGCGAACAA ACCTACCGCG TCCGTGGCTA CTCTACCGTG

TCCAGCGCAC CACCTTGGTG TGGGAGCTTA AAGAAGACGG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCGCTGA GGACCTTGGC GTTGGCGCGT ACACCTTGA  
AGGTGCGGCG GTGGAACCA ACCCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGGTAGCTC GTAATGTGCT AGCTCGGACT CTTGGAACCG GAACCGCGCA TGTGGGAAT

GGATCTCGTG GGTGGCGCTG GCACTGAGAA CCGGGAAGCT ATCGCGCTA CTTCGCGCG CACCGCGCTT GATGCACACC GTGATCGGTT GCGTGGCTCC  
CCTAGAGCAC CCACCGGAGC CGTGACTCTT GCGCTTCTGA TACGCGCGAT GAAAGCGCGC GTGCGCGGGA CTACGTGTGG CACTACGCAA CCGACGACGG

GCAGGTGCGA TGTCTATCT CAACCGCGAT GTGACTCCT TGAAGCATCG TGCACAAAAG CCGCTTTCCT TGTTCGCGA CCGGACGACC CAGGATGCT  
CCTCACGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTTCG CCGGAAGGGA ACCAACGGCT CCGCTGCTGG GTCCGTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGCGCAAGCA CGAAGAGATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCACCGG TGTGGAAAG CATCGTGGAG GGTCTGCGG  
ACCGGTTGGT GCTTCTCTAG CTAATGAGTC TTTTCTCTAG AAGGTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGCGG

GACACCTGGA GGAATTCGC GCTCGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGCG GTTCCAAAT CCACCCGCTC TGTGTTGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGGG  
CTGTGCACCT CTTTAAGCG CGAGCGTAGC GAGTGCACCT ACACCTAGCG GAAGGTTTTA GGTGGCGGAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCG

AGGGGCGCGT TTCATCATGG AGTGCAGTC CGCATCGCTT TCTTTGGGAA TGATTCTGTA GCCTACCGAG CCGGGTGAAG TCGCTCGCGT GTACTCTCGC  
TCCCGCGGCA AAGTAGTACC TCAGGTTAGC GCGTAGCGGA AGAAACCTTT ACTAAGCACT CGTGATGGTC GCGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG

TACGCAGCGG CAATTTCCGT GCTGTGCGAG CCGGATCGTT TTGTTGGGAA TTACGATCAC CTCGTACCGG TTGGCGGTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT  
ATGCTCGCC GTTAAAGGCA CGACAGCTC GCGCTAGCAA AACACCGCTT AATGCTAGTC GAGCGATGGC AACCGGATG GAGAGTAGAA GCGCAGGACA

GCAAGAGCTT CATCATGAT CCTGTCCAGG TACGACCGGC GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA  
CGTTTCTGAA GTAGTAAGTA GACAGGGTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACGACTAC GGTAGGACGA GTAGGAGAGA CACGAAGTAC TACTTCTCAT

CGACCGACTC GGTGGCGAGG GTGCGCGTTT TGATCTGGAT ATCTCACCGG AGGTTATTGA TGAGGAGGAA GTGCGCGCGG CCATCAAGCT GGGTGGGAAG  
GCTGCGTGAG CGACGGCTCC GACGCGGAAA ACTAGACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTGCTGCTT CAGCGGGCGG GGTAGTTGGA CCCACGCTTC

ATCTTTGGCG TCAACCAAGG CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGAA TCGTTACAGT GCGCTGTCCA AGCTCATTC AGCAGATGCC GTGCTGCTGT  
TAGAAACCGG AGTTGCTGGC GTTGGACGTA CTAGACAGGT AACTAAACCT AGCAAGTGCA GCGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACGG CACGAGCACA

CTGAGTCTGG CGTGGCGGAT ACCGAACCGG TCGGCGAGCT AGGTGGGCGC TCCAATGCAT TCCTCGTTGG CTCCGAGCTG ACCAGGCGAG AAAACGTGGA  
CACTCAGACC GCACCGGCTA TGGCTTTGGC AGGCGGTGGA TCCACCGCTG AGGTTACGTA AGGAGCAACC GAGGTTGAC TGGTGGTCC TTTTGCACCT

TCTGGCAGCG CGGCAATTGG TCTACGGCGG CAACAAAGTC TCGGAGTCA CCTCACCAAG TGCAGCAGAA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGC GGTCTACGGC  
AGACCGTCCG GCGCTTAACC AGATGCGCGG GTTGTCTCAG ACCTGAGT GAGTGTGTTT ACCTGCTGTT TGGCGAGCGG GTGCGCCAGC CGAGATGCGG

GCGCTCATCT TCGAAGAGCG ATCGCCACGT AATGTTTACG GTGAACATC GCAAAAAATC ATCGCGCGAG AGCCCAACCT GCGCTACGTC GCGGTGAGCC  
CGCGAGTAGA AGCTTCTCCG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CTTTTTTAG TAGCGCGCTC TCGGGTTGGA GCGGATGCG AGCCAGTCCG

CTGCCACCTC CCGGTACAGG GATTTGCTTG TCGACGGCAT CTTCGCGGTA CAAATCCAGG CCCCAGTGA GCGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCATTGAT  
CAGGCTGGAG CCGCATGTTT CTAAACGAAC AGCTGCGGTA GAAGCGGCGT GTTTAGGTGC GGGGTGACGT CCGCTGCGAG CTTCGCTTTT TCCGTAACTA

GCGCGCGGTT CGTGAAGAGG TTGGACGCGA GGTCCAGGTC TGGCGCGGGA TCTCGATGTC CAGCCCGCTG GGGGCTGAAG TGGCAGAGGG TGACGTGAT  
GCGCGCGCAA GCATTTCTCC AACCTGCGGT CCAGGTCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG GTCGGGGAAC CCGCGACTTC ACCGTCTCC ACTGACGCTA

AAGCTAATTC TTGATGCCCA TGAAGGTGGC AGCGGGGAAG TATTGAGTGC GGCTACGGTG CCGCGCGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC CCGGGAGGCA  
TTGATTAAG AACTACGGGT ACTTCCACCG TCGCGCGTTC ATAAGGTGAC CGGATGCCAG GCGCGCGGAC ACTTCGCTTT CAGAAACGAG GCGCTCCGT

TCTCTCGGGA CAACGCTGCG CAGGCACTCG CTCTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGCGGTGGA ATACCCCGCC GGTGACGGCA GGTGGGCTG  
AGAGAGGCTT GTTGGACGCG GTCCGTGAGC GACACCGGAC GCGTCCAAAT CTGTACTTGA GACCGCACTT TATCGGCGCG CCACGTCCGT GACCCCGGAC

GCGCGAAGAA TCGCGCGCGG CTGCTGAAAA TTTTGGCGAC CATCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAAACTTGG  
CGCGCTTTCT ACCGCGCGCG GACCACTTTT AAAAGCGCTG GTAGAGGTGT AAGGTAATGA TTTCCAAATT TATCCTAGTA CTGACTTTTT CTTTTGAACC

GCGGCTCCAC GCTGCTACCT GCATACTTCC GTGAATTGCG CCGCCAGTTC GTGCGGGAAT CCCTCCTGCC TGCTCTCGAC CAGCTGGAGA AGGCTTCTGT  
CGCGCAGCTG CGACGATGCA CGTATGAAGC CACTTAAGCC GCGGCTCAG CAGCGCCTTA GGGAGGACGG ACCAGAGCTG GTCCAGCTCT TCCGAAGCA

TGACGCCACC AACAGCCAG AGTTCCGCGA AGAACTCGGC GGCTACCTCC GCGATTATCT CCGCGCGCGA ACCCGGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA  
ACTGCGCTGG TTGTCGGGTC TCAAGGCGCT TCTTGACCGG CCGATGCGAG CGCTAATAGA GCGGCGGCGT TGGGCGGACT GGTTCAGAG GTTGCACGGT

CTCGCAGCGG AAGCCAAAGG CTTTGGCGCG ATCTTCTCTA AGCGCGAAGA CCTGCTCAC GCGGCTGCA CCAAACTAA CCAGGTGATC GCGCAGCTGC  
GAGCGTCCG TTCCGTTTCC GAAACGCGCC TAGAAGGAGT TCGCGCTTCT GGAGCAGGTG CCGCCACGTG TGTGTTGATT GTTCCACTAG CCGGTCCAGC

TGCTTGCCAA GCGCATGGG AAAACCCGCA TCATCGCAGA GACCGCGGCA GCGCAGCAGC GCACCGCAC CGCTCTGCA TGTGGGCTCA TGGGCTGGA  
ACGAACGGTT CCGGTACCGG TTTTGGGCGT AGTAGGCTCT CTGCGCGGCT CCGGTGCTGC GTTGGCGGTG GCGAGAGCTT ACACGCGAGT ACCCGGAGCT

GTGCGTTGTC TACATGGGCG CCAAGGAGCT TGCGCGGCG CAGCGCAAGC TCTACCGCAT GCAGCTGCAC GCGCGGAAGG TCATCCCGCT GCAATCTGCT  
CACGCAACAG ATGTACCGCG GGTTCCTGCA AGCGCGGCTC GTGCGGTTGC AGATGGCGTA CGTGGAGCTG CCGCGCTTC ATAGGGGCA CTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCACCC TGAAGGACCG CGTGAATGAA GCGCTGCGCG ATTGGACCGG AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCG GCGCGCGACC  
AGCGCGTGGG ACTTCTCGCG GCACCTTACTT CCGGACGCGG TAACCTTGGG TTGGAAGGTC CTCAGGGTGA TGGAAAGACG GTGGCGCGCG CCGCGCGTGG

CATTCCCAAC CATCGTGGGT GAATTCACAC AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCG CACCGGCAAG CTTCGCGACG TTGTGGTGGC  
GTAAGCGTTG GTAGCACGCA CTTAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTGGG TTCCGTGTCT ACGATCTCGC GTGGCGCTTC GAAGCGCTGC AACACGACCG

CTGTGTGGGT GGTGGCTCCA ACGCCATCGG CATGTTCCGA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTGGCGCTGC AGCCAGCGCG TGAAGGCTTC  
GACACAGCCA CCACCGAGGT TGGCGTAGCC GTACAGCGT CTGAAGTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGCGAC TCGGTGGGGC ACTTCCGGAG

GACTCCGGCA AGCACGGCGC AACCATCACC AACGGTCAGA TCGGCATCCT GCACGGCACC CGTTCTTACC TGATGCGCAA CTCGACGGCG CAAGTGGAAG  
CTGAGGCGGT TCGTGGCGCG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT AGCGGTAGGA CGTGGCGTGG GCAAGGATGG ACTACCGGTT GAGGCTGGCG GTTCACCTTC

AGTCTTACTC CATCTCGCGC GGACTTGATT ACCCAGGCGT CCGCCACAGC ACCCACCCT GCACGCCACC GCGCGCGACT ACGTTGGTAT CACCGACCGC  
TCAGGATGAG GTAGAGGCGG CCGAAGCTAA TGGGTCCGCA GCGCGTCTCG TCGGTGTGGA CGTGGCGTGG CCGCGCGTGA TCGAACCATA GTGGCTCGCG

GAAGCGCTCC AAGCATTCCA GTAGCGTGG CCGCTACGAA GGCATCATCC CCGCGACTGG AATCCTCACA CCGGTTCGCG TACGACTCAA GCGCGCCAAG  
CTTCCGGAGG TTCTGAAGGT CATCGGAGCG GCGGATGCTT CCGTAGTAGG GCGCGTGACC TTAGGAGTGT CCGCAAGCGG ATGCTGAGTT GCGCGCGTCC

ACCGCGGAAG AGGAAGGCGA GAACCTAACC ATCCTCGTCT CCCTATCCGG CCGTGGCGAC AAGGACGTTG ACCATCGCGC CCGCAGCCTC GAAGAAAAATC  
TGGCGCGTTC TCTTCCGGT CTTCGATTGG TAGGACGAGC GCGTAGGCGC GGCACGCGTC TTCTGCAAC TGGTAGCGCG GCGGTGGGAG CTCTTTTATG

CAGAACTGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CCGTTACGAC GATCTTTTTG GCGACGCGTC GACACGGTCA GGGGAGGGCG CCTTTGTTCC CTTCATCATG  
GTCTTGACTA GGACTTCCGT TTGGCTACTC GGCAATGCTG CTAGAAAAAC CGTGGCGGAG CTGTGCGAGT CCGCTCCGCG GGAACCAAGG GAAGTAGTAC

CTGAGCGACC CTTCACACAG GGAGGGTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAACGTGGC GCAGATGCAC TGGAACTTGG CGTACCTTTC TCGGACCGAG  
GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CCGCGGAAG GTCTAGTAGA GGTGTCTTAA GCTTGCACCG CGTCTACGTC ACCTTGAAAC GCATGGAAAG AGGCTGGGTC

TTGGCGATGG CCGCACCGTC GCGGAATCCC ACCTCCGCGC ACTCGAGCGG GCGCGCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGCGACG  
AACGCGTACC GCGGTGGCAG GCGCTTAGGG TGGAGGCGCG TGAGCTGCGG CCGCGGTGGC ATCTGTGCGG TGAGTCTGTC TAGTTCGCGC ACGCGCGTCC

CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTTCA CCGTGGGCTT GGATCGCTTC TACCAAGAGT TCGGTGAAGC TGGCGCAGAC  
GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTACAGAGTA GATGCGGTG CAAGGAAAGT GGCACCGGAA CTAGCGAAG ATGTTCTCA AGCGACTTCC ACCCGCTCTC

TCCATCTCC TCCAGACGT CCCAGTCCGC GAAGCGGCAC CGTTTTCTGC AGCAGCGCGA GTTCATCCCA TTACATCGC TCGCGCCAAC GCGAGCGAGA  
AGGTAGGAGG ACGGTCTGCA GGTTCAGGCG CTTCGCGTGC GCAGGAGCG TCGTGGCGCT TAAGTAGGT AAATGTAGCG AGGCGGTTG CGGTCTCTCT

AAACCTTCCA GGTGTCTTCC GCGCATCAA AGGGTACAT CTACGCCATC TCGCGCGAGC GCGTCACCGC CACCGAACGT GAATCATCCA CCGAGGCGCT  
TTTGGGAGCT CCCACAGAGG GCGGTAGTT TCCGATGTA GATGCGGTAG AGGGCGCTGC CCGAGTGGCG GTGGCTTGA CTTAGTGGT GGTGCGCGA

GTCCGCGATG GTGACACACA TCAAGAAAT TGATGGCGCA CCCATCCTCT TGGGCTTGG CGTCTCATCC CCTCAGCAGC TGGCAGACCG GATTGCAGCG  
CAGGCGTCA CACCTGTTGT AGTTCTTTAA ACTACCGCT GGTAGGAGA ACCCGAAGCC CTGAGTAGG GGAATCTGC ACCGTCTGCG CTAACTGCGC

GCTGCTTCCG GTGCGATCAC GGGTTCGCG ATCACCAAGA TCATTGCTTC CCACTGCGAA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA CATATGGAGC  
CCACGAAGCG CACGCTAGTG CCGAAGGCGC TAGTGGTTCT AGTAACGAAG GGTGACGCTT CCACTCGTGG GCTTGGGCG GTGGTAGCT CTATACCTGC

GTTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTTATCT CTGCGACTCA AGGCAGCGAC CAAGAAGGT TAGGCGTTTA AATGTGGCAA TGTTTCAGCT GAACATTCT  
CAACTTCTT CCTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGCTGACT TCGGTGCGTG GTTCTTCCAA ATCCGGAAT TTACACCGTT ACAAGTGCA CTTTGTAAGA

GAGAGAAAT AGAAACATCA AAGAAGCCAC CTCCTAGCTC TCGGGCTGGG AGCGCGCTTC TTGTTTTGCG GTTTAGGAAA TCTCAGGCTT TTGAGATCT  
CTCTTTACA TCTTTGTAGT TTCTTGGTG GAGGATCGAG AGCGCGACCC TCGCGCGAAG AAACAACGC CAATCTCTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA

TAGTTTCCAG CCGGTGGGT AGGAGCGCGC GCGGAGGAG CAATCTTAGG GTAGCTCGA GCGCGAGCG TTGGAGTGGC ATCAGCTTC GCTTTCGCA  
ATCGAAGCTC GCGCACCGCA TCTTGGGGC GCGCTCTCTC GTTAGAATCC CATCCAGGCT CCGGCTCGCG AACCTCACCG TAGTGCAAGG CCGAAGAGGT

GCGCGCTACC GTTGGGAGCT GATCC  
GCGCGATGC CAACCTCGA CTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNA が人工的に合成されたDNA 又は微生物に由来するDNA である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレビバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNA が1部置換、変異又は削除されたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNA がプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNA を用いるL-トリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリプトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプテ酵素、第3式はトリプテ酵素、第4式はトリプテ酵素、第5式はトリプテ酵素、第6式はトリプテ酵素、第7式はトリプテ酵素のアミノ酸配列を示す。)

## 第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPHVFSL DVRYHEDASA LFAHLGGTTA DDAALLESAD ITTKNGISSL AVLKSSVRIT CTGNTVVTPP LTDSCRAVVA RLTDQLGOYN TAENTFSPPA									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDERERL TAPSTIEVLK KLFESGYSO ASLPLHGGF AFDFLETPET LPAVEESVNT YPDYQFVLAE IVDLHNDQDQ TAXLTGVSNA PGELEAELNK									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAALP ATERAYOTTP HDGDTLRVVA DIPDAQFRTO INELKENIYN GDYQVVPAR TFTAPCPDAF AAYLQLRATN PSPYMFYIRG LNEGRSVLEF									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASIESNLKF TAANRELQLY PIACRPRCL NPDGSIHDEL DIRNELDMRT DAKIADDTM LVDLARNDLA RVSVPASRRV ADLLOVDQYS RVHNLVSRVT									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLOPELDAL DAYRACHNHG TLTGAPKLRA MELLRGVEKR RRGSYGGAVG YLRNGDMNDH CIVIRSAFYD DGVAAGAGA GVVRDSNPQS EADETLHKAY									
510	520								
AVLNAIALAA CSTLEVIR -									

## 第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTHVVLIDNH DSFVYNLVDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAANPDILCL SPGPCYPADA GNMHALIERT LGQIPLLGIC LGYQALIEYN GCKVEPCGPV  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 HGTTDNHILT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRKVPPI GRVHSLGCVV APDGIESLCT CSSEIGOVIM AARTTDGKAJ GLQFHIPESVL SPTCPIILSR  
 210  
 CVEQLLAN\*

## 第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 HTSPATLKVL NAYLDNPTPT LEEAIEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAG AAKAFIAAAR PFPITGAGLL DSAGTGGOGA NTINITTGAS  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 LIAASGGVKL AKHGNRSVSS KSGSADVLEA LNIPLGLDVO DAVKWEASH FTPLFTPAYM PAIAHVQPVV QALKPPTIFN TLGPLLSPAR PERQINGVAN  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 ANHGQLIAEV FRELCRTRAL VVHGACTDEI AVHGTTLVWE LKEDCTIEDY TIEPEDLGLG RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACTGPDA HHDALAASAG  
 310 320 330 340 350  
 AHFYLNQDVO SLKDGAKAL SLLADATTOA WLAKBEEIDY SEXESSND\*

## 第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTSNNLPTVL ESIVEGBRCH LEEIRARIAH VDVDAIPKST RSLFOSLNQG RGGARFINEC KSASPSLCHI RENYQPGELA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIDPVQVR PARYFGADAI LLMLSVLDE EYDALAAEAA RFDLDILTEV IDEEEVARAI KLGAKIFGVN HRLHDLSD  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 LDRSRRLSKL IPADAYLVSE SGVROTETVR QLGGSNAFL VGSQLTSDEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQTARAA GAVYGG LIFE EASPRNVSRG  
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 TSQKIIAEEP NLRVYVVSRR TSGYKOLLVD GJFAVQIHAP LQGSVEAEKA LIAAVREEVG PQOVVHRAIS HSSPLGAEVA EGDVOKLILD AHEGGSGEVF  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 DWATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSG VEYPAGACTW GWCERCRRAA ENFRDHLHIP LLEK\*



## 第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGG TLLPAYFGEF GGFVAESLL PALDQLEKAF VDATNSPEPR EELGGYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLAGEGK GFARIFLKRE DLVHGGANST

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
NOVIGOVLLA KRMGKTRITA ETCAGQBGTA TALACALHGL ECVVYHGAKD VARGQPNVVR MOLHGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALRDMT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQHLE RTGKLPDVVV ACVGGGSNAI GMFADFIDDE GVELVGAEPK GEGLOSGKHG ATITHGQIGI LGCTRSYLMR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
NSDGOVEESY SISAGLDYPC VGHSTHTCTP PARTTLVSPT PKPSKHSSSL ARYEGTIPT GILTRVRLRL KRKATAEEEG QNLTIIVLSL GRGDKVDVHR

410     420
AGTLEENPEL ILKDNR

```

## 第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSQPS PEEAFQIIST AIERCADALE LGVPPSDPVA DGPTVAESHL RALDGGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPIGM

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGRVPFTR GLDRFYDEFA EACADSILLP DVPVREGAPP SAAAGTDPIY IAPANASEKT LEGVSAASKG YIYALSRDGV TCTERESSTD GLSAVVONIK

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSQHVVA DAIAGASGA ITGSAITRII ASHCEGENPM PSTIRDMDGL KXDLTEFISA TEGSDDEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニューエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるL-トリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌(Coryneform bacteria)は、バーゼース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergeys Manual of Determinative Bacteriology)第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレビバクテリウム・サッカロリチウム

ATCC 14066

ブレビバクテリウム・インマリオフィウム

ATCC 14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム

ATCC 13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825

ブレビバクテリウム・フラバム ATCC 13826

ブレビバクテリウム・チオゲニクリス

ATCC 19240

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム

ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム

ATCC 13032, 13060

コリネバクテリウム・リリウム ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ATCC 17965

マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム

ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニューエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域 (*trpL*)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5'-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

し(例えばH. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)の方法が使用できる。)、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離(クローン化)できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、市販の種類制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE. coli、B. subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- (1) pAM 330 特開昭58-67699参照
- (2) pAM 1519 特開昭58-77895参照
- (3) pAJ 655 特開昭58-192900 参照
- (4) pAJ 611 同上
- (5) pAJ 1844 同上
- (6) pCG 1 特開昭57-134500 参照
- (7) pCG 2 特開昭58-35197参照
- (8) pCG 4 特開昭57-183799 参照
- (9) pCG 11 同上
- (10) pCC 1 特開 (Mautin/Ajico)

- (11) pBL 100 特開 ( )  
 (12) pBR 322  
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159(1970)) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルパ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

ブレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、ブレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153(1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111(1979); Dobb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Frink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、ブレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アザセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagino, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に依りアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含む澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産量が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、ブレヴィバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インタ

ーフェロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが濫用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異ならないように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

#### 実施例1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼ $\beta$ サブユニット遺伝子のクローニング

##### 1-1 ブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225 (PERM-P4370) を1 $\mu$ lのCHG培地（ペプトン1g/dl、酵母エキス1g/dl、グルコース0.5g/dl、及びNaCl 0.5g/dlを含み、pH 7.2に調整したもの）に接種し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5 $\mu$ gのDNAを得た。

##### 1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子量5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するプレ  
ビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037  
を100 mlのCMC培地に接種し、30℃で対数  
増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処  
理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心  
により上清を得た。フェノール処理ののち、2容  
のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これ  
を少量のTEM緩衝液(20 mMトリス塩酸塩、20  
mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0))に溶解後、塩  
化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠  
心によりプラスミド画分を分離し、最終的に  
pAJ1844 プラスミドDNA 約200 µgを得た。

### 1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10 µgと1-2で得たプ  
ラスミドDNA 5 µgとを制限エンドスクレアーゼ  
Pst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断  
した。65℃に10分間加熱した後、両反応液を  
混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、  
T<sub>4</sub> フェージ由来のDNAリガーゼによって10℃  
に24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5 Mシュウクロース、20 mMマ  
レイン酸、20 mM塩化マグネシウム、3.5%ベナ  
ッセイブロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)  
0.5 mlで洗浄した。次いで10 mg/mlのリゾチ  
ームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間ブ  
ロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠  
心分離後、プロトプラストをSMMPで洗浄し0.5  
mlのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られ  
たプロトプラストと1-3で調製したDNA 10 µg  
を5 mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリ  
コールを最終濃度が30%になる様に添加した後、  
DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温  
に2分間放置した。このプロトプラストをSMMP培  
地1 mlで洗浄後、SMMP培地1 mlに再懸濁し、  
形質発現のため、30℃で2時間培養した。この  
培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地に塗  
布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1 mlあ  
たりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン  
12 g、KCl 0.5 g、グルコース10 g、  
MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 8.1 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.2 g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2  
倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱  
を採取した。

### 1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリ ボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺 伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブ ユニット遺伝子のクローニング

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのア  
ンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリ  
ボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株№  
38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠  
損株№30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メ  
チル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変  
異処理することにより分離した)をDNA受容  
菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストト  
ランスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を  
5 mlのCMC液体培地で対数増殖期の初期まで培  
養し、ペニシリンGを0.6ユニット/ml添加後、  
さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

ペプトン4 g、粉末酵母エキス4 g、カザミノ酸  
(Difco社) 1 g、NaHPO<sub>4</sub> 0.2 g、コハク酸ナトリ  
ウム13.5 g、寒天8 g及びクロラムフェニコー  
ル3 µg/mlを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々  
約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニー  
が出現してきたのでこれを最少培地(2%グルコ  
ース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1  
%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシ  
ウム7水塩、2 ppm鉄イオン、2 ppmマンガンイ  
オン、200 µg/mlサイアミン塩酸塩、50 µg/ml  
ビオチン、カザミノ酸(Difco) 3 g/l、クロラ  
ムフェニコール10 µg/ml、pH 7.0、寒天  
1.8%)にレプリカし、クロラムフェニコール耐  
性でかつトリプトファン要求性の消失した株を  
AS60を用いた区分から2株、№38を用いた区分  
から1株、№30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、い  
ずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844  
よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

#### 1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

#### 1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

#### 実施例2

ブレヴィバクテリウムラクツフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング  
ブレヴィバクテリウムラクツフェルメンタム  
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSalI、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119 (1985)) の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119 (1985)) を形質転換し、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside), IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含む寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kb.のPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grinstein, M., Wallis, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York (1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロ

ンを得た。BamHI 区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、~~ptrpD3851~~<sup>ptrpD3851</sup>、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及び~~ptrpD3851~~<sup>ptrpD3851</sup>のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

#### 実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

### 3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド p<sub>trpE97</sub> から第1図に示した約2 kb. の SstI-EcoRI断片を分画し、SstI, EcoRIで切断した pUC19 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分画し SstI, Hind IIIで切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8,  $\lambda^{-}$ ) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いはSstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coliの要求性を消失させた。

### 3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド p<sub>trpE97</sub> から第1図に示した

列はプレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNAポリメラーゼの結合部位(trpプロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(trpD)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(trpB, trpA)に対応するDNA配列、及び停止配列(ターミネーター)を含むことが判明した。

又、プロモーターとtrpE構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに関与するリーダーペプチド(trpL)をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された(第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHIで切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No 5644 (trpA33, rha-7,  $\lambda^{-}$ ) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例4.

### トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られた p<sub>trpE36</sub>、p<sub>trpD3851</sub>、p<sub>trpB301</sub>及び実施例2で得られた p<sub>trpE97</sub> を有する形質転換株から各々プラスミドの調製を行った。各々のプラスミドの挿入DNA断片について pUC18 或いは pUC19 又は M13mp10 (Messing, J. and Vieira, J., Gene 19, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示すDNA塩基配列が得られ、この塩基配

### 実施例5.

#### プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、p<sub>trpE97</sub>、或いは p<sub>trpE36</sub> の EcoRI-Hind III断片(約550 bp.) を E. coli のプロモータープロベクター p<sub>kl75-6</sub> (アンピシリン耐性(Ap)、テトラサイクリン(Tc)感受性) (Brosius, J., Gene 27, 151 (1984)) にサブクローンした。得られた組換えプラスミド p<sub>trpP01</sub> は E. coli 中で Tc 耐性を発現した。

さらに、pAM330 由来のトリメトアリム耐性のベクター、pAJ226 の PstI 切断部位に PstI で切断した上記組換えプラスミド p<sub>trpP01</sub> を連結し、プレバクテリウム AJ11225 を形質転換したところ Tc 耐性の発現が認められた。この組換えプラスミド p<sub>trpP02</sub> を有する形質転換株の Tc 耐性度は第1表に示したように、Trp. 存在下では Tc に対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると考えられる。

第1表 カザミ菌を添加した最少増地におけるチトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	チトラサイクリン耐性度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		トリプトファン添加 ( $\text{mg}/\text{mL}$ )	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加	トリプトファン無添加	トリプトファン添加
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	25	25	5	5
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
pEB003TR* in <i>E. coli</i>	400	400	200	200

\*pEB003TRは28. coliのトリプトファンプロモーターを有している

スミド pAJ234 を用いて、L-トリプトファン生産について検討した。

pAJ234 を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株 *Brevibacterium lactofermentum* M247 を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られた AJ12195 (FERM-P8014) を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地 (グルコース 13.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 g、フマル酸 1.2 g、酢酸 3 mL、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g、d-ビオチン 50  $\mu\text{g}$ 、サイアミン塩酸塩 200.0  $\mu\text{g}$ 、メチオニン 40.0 mg、チロシン 65.0 mg、大豆蛋白加水分解液「味液」5.0 mL、 $\text{CaCO}_3$  5.0 g を水 1 L に含む、pH 6.5) 20 mL を 500 mL の坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中のL-トリ

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK466<sup>175-6</sup>上にサブクローン化した (第5図)。その結果AluI-HindIII断片 (51bp) 及び HaeIII-HindIII (135bp) 上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を *E. coli* のプロモータープロベクター pKK232-8 (Ap耐性、クロラムフェニコール感受性) を用いて得ており、AluI-HindIII断片 (51bp) 上にプロモーターが存在することを確認した。

#### 実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングした *Brevibacterium lactofermentum* M247 のうち trpD, trpC, trpB, trpA の4遺伝子を有する組換えプラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042 を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のL-トリプトファン蓄積量

菌株	L-トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247 を得るためには寄託された AJ 12195 より宿主細胞を扱うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる (Bact. Rev., 36, p361-405 (1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195 を CMG 液体培地に接種し、37℃で一晩培養 (高温処理) 後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しない CMG 寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクロラム



フェニコール感受性株として分離される株が  
N 247 である。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 圖

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素  
地図

第 2 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため  
の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18、pUC19 或いはM13mp10 にクローン化し、矢印で示した方向へ、dideoxy 法により塩基配列を決定した

第 3 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの制御領域  
—ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
trpE構造遺伝子の 5' 上流域の塩基配列並びに  
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

RNA の 2 次構造 -

第 4 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、  
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第 5 図

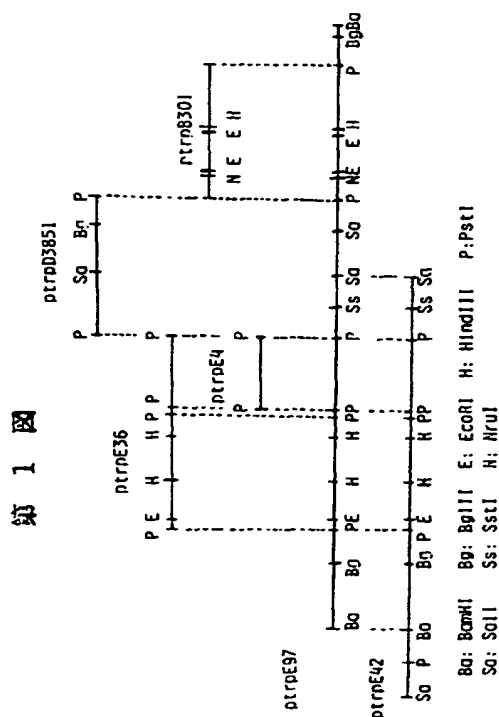
ブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、  
オペレーター領域の限定のための戦略

-35 及び -10 は *E. coli* のプロモーターコンセンサス配列の -35、及び -10 領域に相当する領域を示す

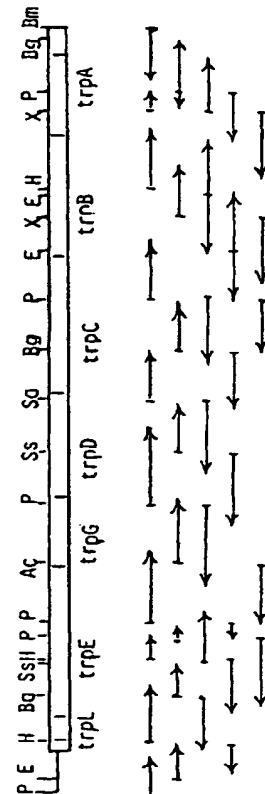
第 6 図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンのターミネーターの構  
造

特許出願人 味の素株式会社



第二章



## 第 3 図

```

trpL
MetAsn
-35  TACACAAGAACCCAAATGATTAAATAATTGAGACAAGCTTCCACTATGTGATAAAGTCCCATTTTGTGAAT
-10
AsnSerCysLeuSerGlnSerThrGlnTrpTrpTrpArgAlaAsn...
AACTCTTGCTCAGTCAAAAGCACCAGTGGTGGCGGCTAACTAAGCGAGCCTGACACCTCAAGTTGTTT
TCACCTTTGATGAATTTTAAAGGCTCGTACTTCGTTCCGACGAGAAGCGGGCCTTTTGTGGTTTTAGCCAC
AACCGGCAAGCCCTGGATCGAATGAAGCTCGCAGCGAGTAATTATTGATGTTTCCGAGAAAGGCTTCAGCCC
CACAAATGATTTCCACGGTAGGTCGCCCATGAGCAGCAAT
MetSerThrAsn
trpE

```

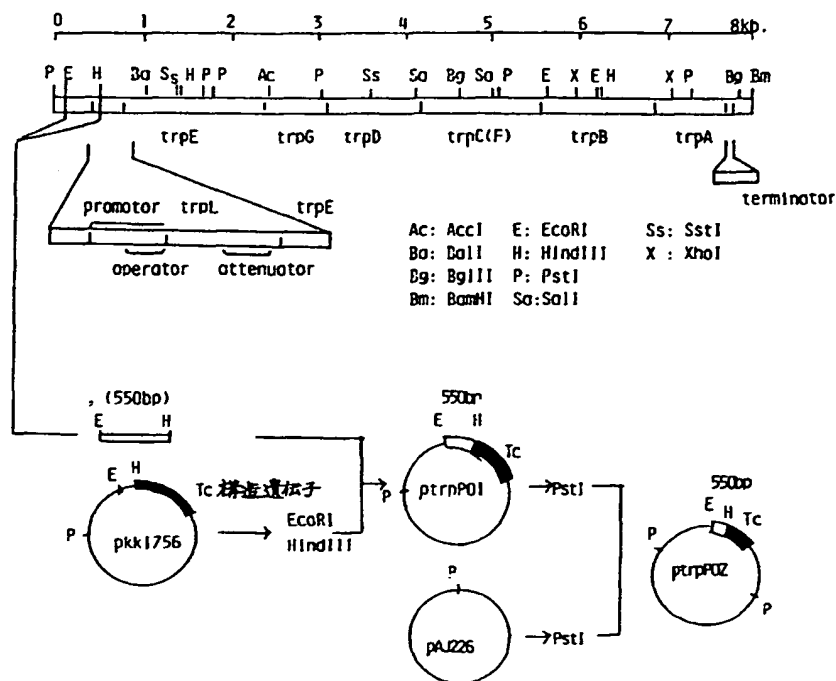
## 第 5 図

```

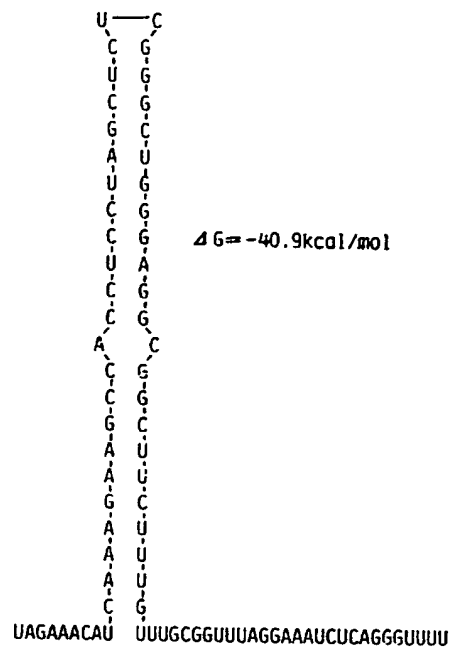
HaeIII
AGGAGGCTGG TGGTGTGACT ATTAAGCTGC CGATTATCA CAGAGTCCG CTGAATGCC CCAGATTTGA
TCTTGGCC ACCACACTGA TAATGAGGC GTTATAGTT GTTGAAGCC GACTTACGGG GGTCTAAGT
-35
CTTGGATCCA GTGCTAGC TCGCGAAG TACACAGAA CCCAAATG ATTAATAAT GAGACAAGCT T
GAACTTACGT CAGGATCTC GAGGCTTTG ATGGTCTT GGGTTTAC TAAATATTA CTCTGTTCGA A
HindIII
-10

```

## 第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

// C 12 P 21/02  
 (C 12 P 13/22  
 C 12 R 1:13)  
 (C 12 P 13/22  
 C 12 R 1:15)

6712-4B

**特許庁長官殿**

## 昭和61年特許願第87600号

トリアトファンオペロン、トリアトファンオペロンにコード  
されるペプチド及び蛋白、トリアトファンオペロンの遺伝子  
発現利用方法及びトリアトファンの製造法

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌 山 勝 弘

#### 4. 補正命令の日付

**自死**

### 5. 補正により増加する発明の数

なし

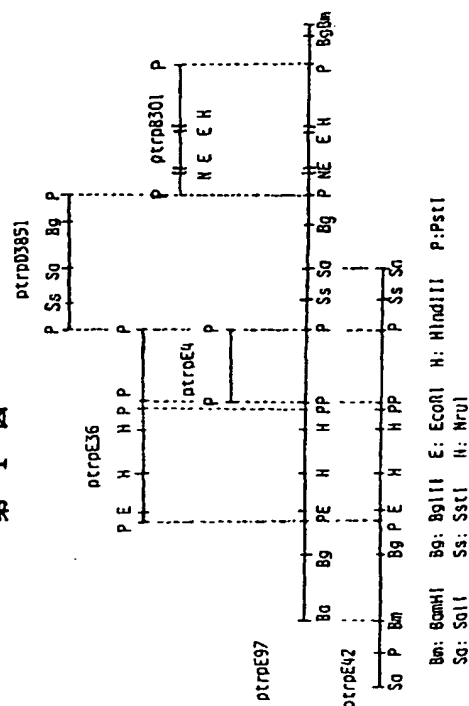
## 6. 補正の対象

### 明細書の発明の詳細な説明の欄

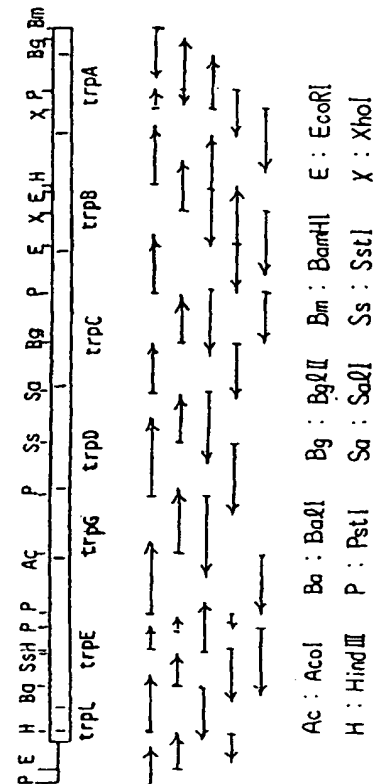
および図面（第1図、第2図、第4図）

1. 6. 4

# 圖 1 第

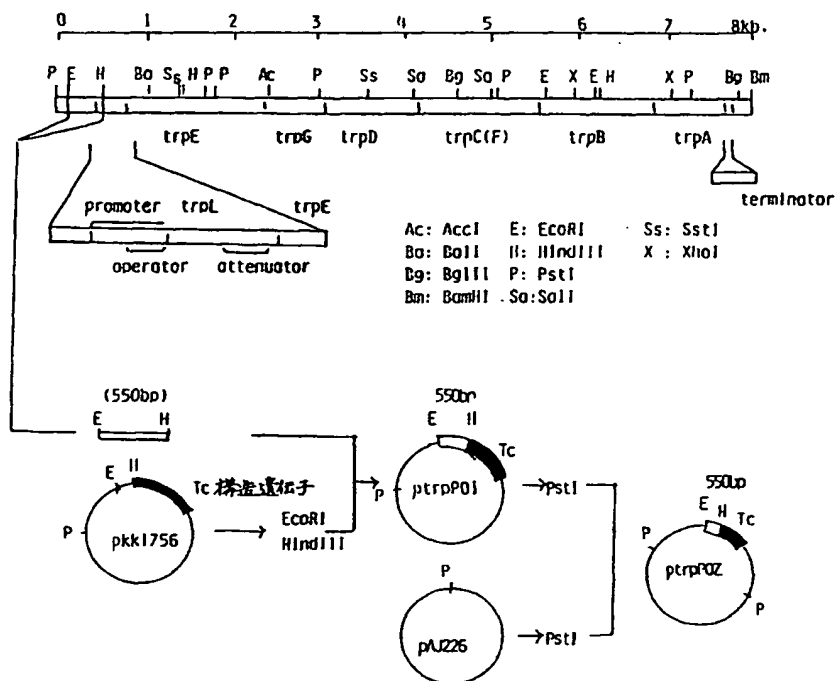


第 2 圖



Ac : Acol    Ba : Ba2I    Bg : Bg2II    Bm : BamII    E : EcoRI  
H : HindIII    P : PstI    Sa : Sa2I    Ss : SstI    X : XhoI

第 4 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**